

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-026309

(43)Date of publication of application : 25.01.2000

(51)Int.Cl.

A61K 38/00

A61K 31/00

A61K 35/22

A61K 47/26

// C07K 14/435

(21)Application number : 11-153856

(71)Applicant : MOCHIDA PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 16.12.1994

(72)Inventor : KUNIHIRO YASUYUKI

TANAKA AKIRA

HATAKE SEISHICHI

SUZUKI SHIGEJI

KUDO YUMIO

(30)Priority

Priority number : 05318405 Priority date : 17.12.1993 Priority country : JP

## (54) SOLUBLE THROMBOMODULIN-CONTAINING COMPOSITION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject composition capable of manifesting excellent stability even at the time of preservation for a long period without causing adsorption onto a container even when diluted to a low concentration and useful as a prophylactic and therapeutic agent for blood coagulating diseases by including a soluble thrombomodulin and a specific reducing substance for stabilizing the soluble thrombomodulin as essential ingredients.

SOLUTION: This composition is obtained by including (A) a soluble thrombomodulin and (B) one or more kinds selected from maltase, lactose, sucrose, arginine and salts thereof. The ingredient A is preferably a human urine-derived or a recombinant human soluble thrombomodulin. (C) A nonionic surfactant as an adsorption preventing agent is further preferably added to the composition. The composition is prepared by separately preparing, e.g. a composition consisting essentially of the ingredients A and B and the ingredient C, mixing both in use and then freeze-drying the resultant composition in a solution state. The amount of the added ingredient B is preferably about 0.1-1,000 mg based on 1 mg potency of the ingredient A.

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-26309

(P2000-26309A)

(43) 公開日 平成12年1月25日 (2000.1.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テラコート <sup>®</sup> (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 37/02	
31/00	6 0 7	31/00	6 0 7 A
35/22		35/22	
47/26		47/26	
// C 0 7 K 14/435	Z N A	C 0 7 K 14/435	Z N A
		審査請求	未請求 請求項の数 1 O L (全 19 頁)
(21) 出願番号	特願平11-153856	(71) 出願人	000181147
(62) 分割の表示	特願平7-516672の分割		持田製薬株式会社
(22) 出願日	平成6年12月16日 (1994.12.16)		東京都新宿区四谷1丁目7番地
(31) 優先権主張番号	特願平5-318405	(72) 発明者	国広 靖之
(32) 優先日	平成5年12月17日 (1993.12.17)		東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	田中 亮
			東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内
		(74) 代理人	100080159
			弁理士 渡辺 望穂 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性トロンボモジュリン含有組成物

## (57) 【要約】

【課題】長期間に渡り安定性に優れ、容器への吸着が防止された血液凝固疾患に係わる疾病の予防および治療として有用な可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、その製法、可溶性トロンボモジュリンの安定化剤、安定化方法、吸着防止剤、および吸着防止方法を提供する。

【解決手段】1種あるいは2種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる1種あるいは2種以上を含有する可溶性トロンボモジュリン含有組成物、およびその製法、並びに可溶性トロンボモジュリンの安定化剤、安定化方法、吸着防止剤および吸着防止方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上とを含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、1種または2種以上の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。また、本発明は、1種または2種以上の可溶性トロンボモジュリンと、非イオン性界面活性剤を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。また、本発明は、1種または2種以上の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上と、非イオン性界面活性剤を必須成分として含有することを特徴とする組成物およびその組成物の製法に関する。また、本発明は、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上を含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化剤に関する。また、本発明は、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上を含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの安定化方法に関する。また、本発明は、非イオン性界面活性剤を含有することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの吸着防止剤に関する。また、本発明は、非イオン性界面活性剤を添加することを特徴とする可溶性トロンボモジュリンの吸着防止方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】トロンボモジュリンはトロンピンを向凝固酵素から抗凝固酵素へと変換せしめるユニークな性質を持つ血管内皮表面に存在する蛋白質として、1981年エスモン (Esmon) ら (プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA) 78, 2249-2254, 1981) により報告された。続く論文において、ウサギ肺組織からの単離精製に成功し、これを報告した (ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) 257 (2), 859-864, 1982)。さらに、ヒトロンボモジュリンの全DNA配列およびアミノ酸配列が報告され (エンボ・ジャーナル (EMBO Journal) 6, 1891-1897, 1987; バイオケミ

ストリー (Biochemistry) 26 (14), 4350-4357, 1987)、各ドメインの役割が明らかにされている。トロンボモジュリンはトロンピンと結合し、トロンピンの持つ血液凝固作用を失わせしめ、トロンピン-トロンボモジュリン複合体はプロテインCを活性化することにより抗凝固作用を示すとされている。すなわち、トロンボモジュリンは血液凝固阻害作用と線溶促進作用の両方の作用を発揮する可能性があり、臨床応用に期待されている。

【0003】従来、血液凝固能異常に係わる疾患の治療剤としては、抗血液凝固作用をもったアンチトロンピン I II やヘパリンが、一方、血栓溶解作用をもったウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター等が使用されている。しかしながら、これらの物質は、出血傾向等の副作用を有し、作用が血液凝固あるいは血栓溶解のいずれかに偏っている。従って、この両方の作用を発揮する可能性があるトロンボモジュリンあるいは基本的にトロンピンと親和性を有しプロテインCの活性化を促進するというトロンボモジュリン活性を有したトロンボモジュリン様物質の臨床応用に期待が高まっている。

【0004】ヒトロンボモジュリンは、溶解性が低く、特に医薬品として利用する場合、精製や製剤化等で問題を生じていた。すなわち、トロンボモジュリンは膜結合性であり、アミノ末端領域、EGF様構造領域、O-グリコシル化部位領域、細胞膜貫通領域および細胞質内領域の5つからなる完全長のアミノ酸配列を持つものは精製過程あるいは製剤化等に際して溶解補助剤を添加する必要がある。このため溶解性の高いトロンボモジュリン様物質 (以下可溶性トロンボモジュリンと呼ぶ) が望まれていた。抗原性等の安全性のことを考慮すると、天然型であるヒト由来可溶性トロンボモジュリンなどがより望まれている。このような可溶性トロンボモジュリンの例のうち、遺伝子工学的手法によるものとして、細胞膜貫通領域および細胞質内領域を除去した可溶性トロンボモジュリン (特開平1-6219号公報、特開平2-255699号公報、特開平3-133380号公報、特開平3-259084号公報、特開平4-210700号公報、特表平3-503757号公報、特表平4-505554号公報、EP474273号公報、WO91/04276号公報、WO91/05803号公報、WO91/15514号公報、WO92/00325号公報、WO92/03149号公報、WO93/15755号公報、土肥ら、日本薬学会、第113年会、講演要旨集3、演題番号30EM14-1, 1993年) が挙げられる。あるいは天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン (特開昭63-30423号公報、特開昭63-146898号公報、特開平3-86900号公報、特開平3-821839号公報、イシイ (Ishii) ら、ザ・ジャーナル・オブ・クリニ

カル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation) 76, 2178-2181, 1985、平本ら、日本薬学会、第108年会、講演要旨集、演題番号 F05 11-1、1988年、矢谷ら、血液と脈管、20, 197-200, 1989、ヤマモト (Yamamoto) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (The Journal of Biochemistry) 113, 433-440, 1993) 等の公知のものがある。

【0005】具体的には、遺伝子工学的手法によるものとして、特開平1-6219号公報には少なくともアミノ末端から345-462番目のアミノ酸配列を含む可溶性トロンボモジュリンが、特開平2-255699号公報には115のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンが、特開平3-13380号公報には少なくともアミノ末端から1-497番目のアミノ酸残基を含む可溶性トロンボモジュリンが、特開平3-259084号公報には468のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンが、特開平4-210700号公報には硫酸化グリコサミノグリカンで修飾されない可溶性トロンボモジュリンが、特表平3-503757号公報にはヒト組織プラスミノゲンアクチベーターのアミノ酸配列の一部を含んでいてもよい可溶性トロンボモジュリンが、特表平4-505554号公報にはヒト組織プラスミノゲンアクチベーター等のアミノ酸配列の一部を含んでいてもよい可溶性トロンボモジュリンが、EP474273号公報には19残基からなるトロンビン結合部位とプロテインC活性化部位とを含んでなる可溶性トロンボモジュリンが、WO91/04276号公報にはコンドイチン及び/又はコンドイチン硫酸を含む糖鎖を有する可溶性トロンボモジュリンが、WO91/05803号公報には硫酸化グリコサミノグリカンで修飾された可溶性トロンボモジュリンが、WO91/15514号公報にはメチオニンを他のアミノ酸に置換することによって酸化を防止した可溶性トロンボモジュリンが、WO92/00325号公報には組織ヒト由来可溶性トロンボモジュリンおよびその変異型物質が、WO92/03149号公報にはO-グリコシル化部位領域の糖鎖を修飾あるいはO-グリコシル化部位領域を欠失させた可溶性トロンボモジュリンが、WO93/15755号公報にはアミノ酸配列を修飾することによって蛋白分解酵素による分解を防止した可溶性トロンボモジュリンが、WO93/25675号公報にはアミノ酸配列を修飾することによってコファクター活性を修飾した可溶性トロンボモジュリンが、各々開示されている。さらに、土肥らはヒトトロンボモジュリン由来の酸性アミノ酸配列を含む配列を付加した可溶性トロンボモジュリンを報告している (日本薬学会、第113年会、講演要旨集3、演題番号30EM14-1、128頁、1993

年)。

【0006】また、ヒト由来の該物質として、特開昭63-30423号公報には非還元状態で分子量が200,000、48,000および40,000からなる可溶性トロンボモジュリンの混合物が、特開昭63-146898号公報には非還元状態で分子量が39,000±10,000および31,000±10,000の可溶性トロンボモジュリンが、特開平3-86900号公報には非還元状態で分子量が55,000±58,000および60,000±65,000の可溶性トロンボモジュリンが、特開平3-218399号公報には非還元状態で分子量が72,000±3,000および79,000±3,000の可溶性トロンボモジュリンが、各々開示されている。さらに、イシイ (Ishii) らは血液中および尿中の可溶性トロンボモジュリンを (ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation) 76, 2178-2181, 1985)、平本らは血中あるいは尿中の数種の可溶性トロンボモジュリンを (日本薬学会、第108年会、講演要旨集、演題番号 F05 11-1、1988年)、矢谷らは尿中の還元状態で分子量が63,000の可溶性トロンボモジュリンを (血液と脈管、20, 197-200, 1989)、ヤマモト (Yamamoto) らは468のアミノ酸残基からなる可溶性トロンボモジュリンを (ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (The Journal of Biochemistry) 113, 433-440, 1993)、各々報告している。

【0007】しかしながら、可溶性トロンボモジュリンは化学的に十分安定とはいえず、例えば凍結乾燥下の状態でも、数ヶ月から数年に渡る長期間室温に放置すると、活性の低下、凝集物の出現等が起る問題となっている。また、凍結乾燥工程の条件によっては、微量ではあるが変性することがあり問題となっている。可溶性トロンボモジュリンが変性して凝集体を生じ、凝集体が混在したままヒト血中に投与された場合、その凝集体は変性した蛋白質であるため、過敏症等の免疫反応を惹起する、あるいは血栓症を誘発する危険性がある。従って、医薬品として使用するにあたっては、医療現場で強く求められている品質を長期間に渡り保証できる製剤を調製することは困難な現状である。

【0008】特定の糖鎖が特定の蛋白質を安定化することがこれまでいくつか報告されている。しかしながら特定の蛋白質を不安定化する、あるいは安定化しないといった報告もいくつかある。例えば、蔗糖はチュープリンを不安定化する (バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ (Biochimica et Biophysica Acta) 532, 155-160, 1978)、また、グルコース等の糖鎖はガン城死因子の活

性を安定化するが、ラクトース、マルトース、蔗糖等の糖類は全く安定化効果を示さない(特開昭59-59625号公報) ことなどが報告されている。

【0009】 トロンボモジュリンあるいはトロンボモジュリン様物質の製剤化について、これまでに報告がほとんどない。限られた情報であるが、例えば、特開平1-6219号公報、特開平2-255699号公報およびWO91/04276号公報中の発明の詳細な説明において、注射剤の添加剤として、蔗糖、グリセリン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースの記載がある。これらの物質は増粘剤として添加されており、安定化効果についての記載はおろか具体的な効果の実証がない。また、特開平1-6219号公報、特開平2-255699号公報、特開平3-218399号公報およびWO92/00325号公報中の発明の詳細な説明において、処方例にアルブミン、精製ゼラチン、あるいはマンニトールを添加した例が記述されているが、その製剤の安定性等、特徴、すなわち添加したことによる効果についての開示がまったくない。

【0010】 そこで、ヒト由来可溶性トロンボモジュリンについて、アルブミン、精製ゼラチン、グリシン、グルコースおよびマンニトールとの組成物を調製し、さらなる試験を行ったところ、いずれも長期に渡る安定性が不十分であることが判った。このように、可溶性トロンボモジュリンを製剤化するにあたり、長期のしかも室温での保存に耐える技術の開示は未だされていない。また、可溶性トロンボモジュリンは比活性が非常に高いため、臨床使用時は1回の投与蛋白量が微量であり、更に輸液で非常に低濃度に希釈して持続投与する場合が多い。可溶性トロンボモジュリンについて輸液で低濃度に希釈したときにはガラス容器、プラスチック製容器あるいは輸液セットへの吸着が起こり、特にプラスチック製容器および輸液セットへの吸着が著しいことが判った。従って、実際に投与をするときに、有効投与量が減少してしまうおそれが生じることが判った。吸着を防止する手段として、塩基性アミノ酸によるセクレチンの吸着防止(特開昭57-169425号公報)、セルロース誘導体や非イオン性界面活性剤、メチルシクロデキストリンによるセクレチン、インシュリン、主に低分子ペプチドの吸着防止(特開昭58-206513号公報、特開昭59-76024号公報、特開昭60-100524号公報)の例が報告されているが、可溶性トロンボモジュリンにおいて吸着を防止する技術についての開示は未だされていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、長期保存時でも安定性に優れた可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供することにある。更に低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらない可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供することにある。更に詳しくは、

長期の室温保存時でも安全で安定性に優れた医薬品として使用可能な可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を提供することにある。更に、低濃度水溶液においても容器への吸着による配合量低下を起こさない医薬品として使用可能な可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を提供することにある。また、本発明の目的は、可溶性トロンボモジュリンの安定化剤および安定化方法を提供することにある。また、本発明の目的は、可溶性トロンボモジュリンの吸着防止剤および吸着防止方法を提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは可溶性トロンボモジュリンの安定性に関する課題点を解消すべく、特に凍結乾燥した組成物について鋭意研究を行い、マルトース(α形、β形、またはα形とβ形の任意比率混合物)、ラクトース(α形、β形、またはα形とβ形の任意比率混合物)であっても良く、以下、特に記載のない場合は、マルトースというときにはこれら全てを包含する)、ラクトース(α形、β形、またはα形とβ形の任意比率混合物)であっても良く、以下、特に記載のない場合は、ラクトースというときにはこれら全てを包含する)、蔗糖、あるいはアルギニン(D体、L体またはラセミ体のいずれであっても良く、以下、特に記載のない場合は、アルギニンというときにはこれら全てを包含する) およびその塩に優れた安定化効果、特に長期間に渡る安定化効果、を見いだした。更に、非イオン性界面活性剤に可溶性トロンボモジュリンを低濃度に希釈した場合の容器への吸着防止効果を見いだして本発明を完成した。

【0013】 従って、本発明は、可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物、並びに同組成物において非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有組成物、および、可溶性トロンボモジュリンと非イオン性界面活性剤を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有組成物を提供する。

【0014】 可溶性トロンボモジュリンは、ヒト由来可溶性トロンボモジュリンであることが好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンは、組換えヒト可溶性トロンボモジュリンであることも好ましい。従って、本発明の可溶性トロンボモジュリンは、前述の従来の技術で引用された公知文献中の可溶性トロンボモジュリンを含有し、これらの文献中の記載を引用し本発明の可溶性トロンボモジュリンの内容とする。

【0015】 そして、ヒト由来可溶性トロンボモジュリンが以下の部分構造及び性質を有する物質であることがさらに好ましい。

イ) 分子量 72,000±3,000

【非還元状態でのドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ーポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)により測定]

ロ) 等電点 3.9±0.2

ハ) 末端アミノ酸配列

N末端 :

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-P  
ro-Gly-Gly-Ser-Gln-Cys-Va  
l-Glu-His-Asp-Cys-Phe-Ala  
-Leu-Tyr-Pro-Gly-Pro-Ala-  
Thr-Phe-Leu-

C末端 :

-Leu-Ala-Arg、または-Leu-Val-  
Arg

ニ) 糖含量 (重量%)

中性糖 : 5.5±1.0%

[フェノール硫酸法で測定]

アミノ糖 : 2.2±1.0%

[Elson-Morgan法 (Bliss変法) で測  
定]

シアル酸 : 2.8±1.5%

[Warren法で測定]

【0016】また、ヒト由来可溶性トロンボモジュ  
リンが以下の部分構造及び性質を有する物質であることが  
さらに好ましい。

イ) 分子量 79,000±3,000

[非還元状態でのSDS-PAGEにより測定]

ロ) 等電点 3.8±0.2

ハ) 末端アミノ酸配列

N末端 :

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-P  
ro-Gly-Gly-Ser-Gln-Cys-Va  
l-Glu-His-Asp-Cys-Phe-Ala  
-Leu-Tyr-Pro-Gly-Pro-Ala-  
Thr-Phe-Leu-

C末端 :

-Leu-Ala-Arg、または-Leu-Val-  
Arg

ニ) 糖含量 (重量%)

中性糖 : 6.2±1.0%

[フェノール硫酸法で測定]

アミノ糖 : 3.1±1.0%

[Elson-Morgan法 (Bliss変法) で測  
定]

シアル酸 : 3.8±1.5%

[Warren法で測定]

【0017】また、2種あるいは3種以上の分子種の可  
溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、  
蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種ある  
いは2種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュ  
リン含有組成物、並びに同組成物において非イオン性界面活  
性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有組成  
物、および、可溶性トロンボモジュリンと非イオン性界

面活性剤を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含  
有組成物を提供する。このときの可溶性トロンボモジュ  
リンの好ましい態様は前記と同様である。また、前記の  
いずれの組成物も凍結乾燥処理されているのが好まし  
い。

【0018】また、可溶性トロンボモジュリンと、マル  
トース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩か  
ら選ばれる1種あるいは2種以上を必須成分とする可溶  
性トロンボモジュリン含有組成物と、非イオン性界面活  
性剤を、それぞれ別々に用意し、用時両者を混合する組  
成物形態を提供する。このときの可溶性トロンボモジュ  
リンの好ましい態様は前記と同様である。

【0019】また、可溶性トロンボモジュリンと、マル  
トース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、  
および非イオン性界面活性剤から選ばれる1種あるいは  
2種以上とを溶解混合する工程を含む可溶性トロンボモ  
ジュリン含有組成物の製法を提供する。

【0020】そして、可溶性トロンボモジュリンと、マル  
トース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその  
塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる1種ある  
いは2種以上との溶液状態の組成物を凍結乾燥する工程  
を含む上述の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製  
法を提供する。

【0021】また、2種あるいは3種以上の分子種の可  
溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、  
蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界  
面活性剤から選ばれる1種あるいは2種以上とを溶解混  
合する工程を含む上述の可溶性トロンボモジュリン含有組  
成物の製法を提供する。

【0022】そして、2種あるいは3種以上の分子種の  
可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトー  
ス、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性  
界面活性剤から選ばれる1種あるいは2種以上との溶液  
状態の組成物を凍結乾燥する工程を含む上述の可溶性ト  
ロンボモジュリン含有組成物の製法を提供する。

【0023】そして、可溶性トロンボモジュリンに、マル  
トース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩か  
ら選ばれる1種あるいは2種以上を添加する可溶性ト  
ロンボモジュリンの安定化方法を提供する。また、マル  
トース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩か  
ら選ばれる1種あるいは2種以上からなる可溶性トロン  
ボモジュリンの安定化剤を提供する。そして非イオン性  
界面活性剤を添加する可溶性トロンボモジュリンの吸着  
防止方法および非イオン性界面活性剤からなる可溶性ト  
ロンボモジュリンの吸着防止剤を提供する。

【0024】また、2種あるいは3種以上の分子種の可  
溶性トロンボモジュリンにマルトース、ラクトース、蔗  
糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは  
2種以上を添加する可溶性トロンボモジュリンの安定化  
方法と、2種あるいは3種以上の分子種の可溶性トロン

ポモジュリンに非イオン性界面活性剤を添加する可溶性トロンボモジュリンの吸着防止方法を提供する。

【0025】また、本発明は、医薬として有効な量の可溶性トロンボモジュリンと、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上を必須成分とする可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物、並びに同組成物において医薬添加可能な非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物、および、医薬として有効な量の可溶性トロンボモジュリンと、医薬添加可能な非イオン性界面活性剤が添加された可溶性トロンボモジュリン含有医薬組成物を提供し、長期保存時でも安定性に優れ、低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらない血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療を提供する。このとき可溶性トロンボモジュリンの好ましい態様は前記と同様である。

【0026】

【発明の実施の形態】以下に本発明を詳細に説明する。本発明において用いられる可溶性トロンボモジュリンは、天然型あるいは遺伝子工学的に生産されたものいずれでもよい。また、遺伝子工学的な手法により得られる改変型あるいはキメラ型の可溶性トロンボモジュリンであってもよい。例として、従来の技術に記載した可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。医薬品とする場合、好ましくはヒトの可溶性トロンボモジュリンが望まれる。さらに好ましくは、天然型のヒト由来の可溶性トロンボモジュリンがよい。また、具体例としては、特開平3-218399号公報に記載の非還元状態での分子量が72,000±3,000(以下、UTM1とする。)または/および79,000±3,000(以下、UTM2とする。)の可溶性トロンボモジュリンが、また、遺伝子工学的に生産されたものとして、W092/00325号公報に記載の経膜ヒト由来可溶性トロンボモジュリン、あるいは特開平1-6219号公報において取得されている、アミノ末端のアミノ酸配列がA1a-Pro-A1aであるアミノ酸/糖48残基よりなる可溶性トロンボモジュリンなどがあげられる。医薬品として用いる場合、可溶性トロンボモジュリンは医薬品として適用可能な程度まで精製されていけばよい。

【0027】また、可溶性トロンボモジュリンは、上述のような可溶性トロンボモジュリンを単独で用いても、あるいは、2種あるいは3種以上の分子種の可溶性トロンボモジュリン混合物であってもよく、その混合比率は任意である。例えば、特開平3-218399号公報に開示される2種類のヒト尿中の可溶性トロンボモジュリンの混合物であってもよい。また、W091/04276号公報に示されるような糖鎖構造の異なる可溶性トロンボモジュリンの混合物であってもよい。このような可溶性トロンボモジュリンは、例えば、天然型については特開平3-218399号公報あるいは特開平3-86

900号公報等に記載の方法で、遺伝子組み換え型についてはW092/00325号公報、特開平1-6219号公報あるいはW091/04276号公報等に記載の方法で製造する事ができる。

【0028】本発明で用いられる安定化剤は、還元性のある二糖類、蔗糖またはアミノ酸である。好ましい、本発明で用いられる安定化のための必須成分としては、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる1種あるいは2種以上が用いられる。アルギニンの塩の場合、無機酸、有機酸との塩があるがその種類としては医薬品として利用可能なものであればよい。好ましい例として塩酸塩、クエン酸塩、硫酸塩等が挙げられ、さらに塩酸塩が好ましい。安定化剤の添加量としては、特に限定されるものではないが、可溶性トロンボモジュリン1mg力価あたり0.1mg~1000mg程度が例示される。より好ましくは可溶性トロンボモジュリン1mg力価あたり0.5mg~500mg程度である。さらに好ましくは可溶性トロンボモジュリン1mg力価あたり0.5mg~100mg程度である。蔗糖に関しては、凍結乾燥体とした場合、可溶性トロンボモジュリンに対する蔗糖の比率が高いと保存中に崩壊しやすいが、可溶性トロンボモジュリン1mg力価あたり0.5mg~50mg程度にするのが好ましい。また、蔗糖を用いた場合、崩壊を抑制する目的でデキストラン等の高分子を適宜添加してもよい。

【0029】なお、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる安定化剤は可溶性トロンボモジュリンを含有する溶液(組成物)1mL当たり100mg以下であることがより好ましい。これらの安定化剤はその量により安定化効果ばかりでなく賦形効果、緩衝効果、等張化効果あるいは分散効果等さまざまな効果を発揮するので、その組成物の使用目的に応じて添加量が決定される。

【0030】本発明で用いられる吸着防止剤は、界面活性剤であり、好ましい成分としては、非イオン性界面活性剤であり、それは医薬品として利用可能なものが好ましいが、特に限定されるものではない。エチレンオキシイプロピレンオキシド共重合体、ポリ(オキシアルキレン)モノ-及びトリ-ソルビタンエステル(ソルビトールの脂肪族エステル及び様々のモル数のエチレンオキシドと共重合したその無水物)、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油等が好ましい。エチレンオキシイプロピレンオキシド共重合体としては、プルロニックF68、ボロクサー188等、ポリ(オキシアルキレン)モノ-及びトリ-ソルビタンエステルとしては、ポリソルベート80(オレートエステル)、ポリソルベート20(ラウレートエステル)、ポリソルベート40(パルミテートエステル)、ポリソルベート69(ステアレートエステル)等、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油としては、HCO40、HCO60等が挙げられる。これら

の非イオン性界面活性剤から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上を用いることができる。1 種を用いる場合は、エチレンオキシッドプロピレンオキシド共重合体、あるいはポリ(オキシアルキレン)モノー及びトリソルビタンエステルが好ましく、プルロニック F 68、ポリソルベート 80、あるいはポリソルベート 20 が好ましく、さらにプルロニック F 68 が好ましい。

【0031】吸着防止剤としての非イオン性界面活性剤の添加量は特に限定されるものではないが、可溶性トロンボモジュリン含有組成物を水溶液とした場合に、当該水溶液中において 0.00005 wt % 以上であることが望ましい。また、これらの物質が生体内に投与された場合に、それ自身が薬理作用をしない程度の低い量であることが望ましく、かかる意味で可溶性トロンボモジュリン水溶液中で 1 wt % 以下の濃度であることが望ましい。これらの吸着防止成分は効果が濃度に依存し、また容器の材質や表面積にも影響を受けるため、組成物の臨床使用時における希釈倍率や希釈に用いる容器の材質や大きさなどによって添加量を調節することができる。好ましくは、当該水溶液中において上記濃度範囲すなわち 0.00005～1 wt % となる量であれば、本発明の目的を達成する上で適当である。さらに、生体内に投与される際は、0.001～0.01 wt % となる量が好ましい。

【0032】本発明で用いられる安定化剤および吸着防止剤の必須成分はマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤はそれぞれ単独で用いてもよい。これらから選ばれる 2 種以上を組み合わせて用いることもできる。組み合わせの例としては、マルトースおよび非イオン性界面活性剤、ラクトースおよび非イオン性界面活性剤、蔗糖および非イオン性界面活性剤、アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、マルトースおよびアルギニン、ラクトースおよびアルギニン、蔗糖およびアルギニン、マルトースおよびラクトース、マルトースおよび蔗糖、ラクトースおよび蔗糖、マルトース・ラクトースおよび蔗糖、マルトース・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、ラクトース・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤、あるいは、蔗糖・アルギニンおよび非イオン性界面活性剤等が挙げられ、混合比率は任意である。また、上記のうち、非イオン性界面活性剤は 1 種あるいは 2 種以上を組み合わせで用いることができる。

【0033】このうち、マルトース、ラクトース、蔗糖あるいはアルギニンから選ばれる 1 種と、非イオン性界面活性剤の組み合わせが好ましく、組み合わせる非イオン性界面活性剤としては、プルロニック F 68、ポリソルベート 80、あるいはポリソルベート 20 が好ましく、さらにプルロニック F 68 が好ましい。すなわち、マルトースおよびプルロニック F 68、ラクトースおよびプルロニック F 68、蔗糖およびプルロニック F 68

あるいはアルギニンおよびプルロニック F 68 の組み合わせが好ましく、混合比率は任意である。

【0034】本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよびマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上の必須成分に加えて、その使用目的に応じた保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよびマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上の必須成分、および非イオン性界面活性剤に加えて、その使用目的に応じた安定化剤、保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、可溶性トロンボモジュリンおよび非イオン性界面活性剤に加えて、その使用目的に応じた安定化剤、保存剤、防腐剤、緩衝剤、増粘剤、界面活性剤等の任意の添加剤を含有していてもよい。医薬として用いる凍結乾燥剤は、その製剤の目的に応じて、医薬製造上許容できる、保存剤、安定化剤、結合剤、賦形剤、崩壊剤、湿潤剤、滑沢剤、着色剤、芳香剤、矯味剤、懸濁化剤、乳化剤、溶解補助剤、緩衝剤、等張化剤、界面活性剤、吸着防止剤、無痛化剤等を含有させることは任意である。特に、pH 調節のための緩衝剤、浸透圧調節のための等張化剤の含有は好ましい。本発明はこれら物質の影響を受けるものではないが、塩濃度が高いと、凍結乾燥を行う際にケーキの形成に害を及ぼすため好ましくない。

【0035】本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物の製造方法は、前記の方法で得られる可溶性トロンボモジュリンを含有する溶液にマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上を加えて溶解し、溶液を得ることにより行われる。

【0036】可溶性トロンボモジュリンの凍結乾燥物にマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上を加えて蒸留水や生理食塩水に溶解してもよい。また、適当な緩衝液に溶解してもよい。すなわち、可溶性トロンボモジュリンとマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上を溶解混合し溶液状態の組成物とすればよい。また、いずれの方法においてもマルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンおよびその塩、および非イオン性界面活性剤から選ばれる 1 種あるいは 2 種以上はその溶液として加えてもよい。医薬品として使用する場合にはこれらの添加剤は医薬品に使える規格を満たすものが好ましい。

【0037】さらにこれらの溶液を通常の方法により凍



結乾燥を行い、ケーキ状のあるいは粉末状に変換された組成物とすることができ、医薬品として使用する場合には、上記の溶液を無菌濾過した後、アンプル、バイアル等に投与量単位で分注することが望ましく、さらに所望により通常の方法で凍結乾燥してもよい。

【0038】また、医薬品として使用する場合、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、一般に使用されている投与方法、すなわち、非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与することが好ましい。凍結乾燥製剤とした場合は、用時、注射用水等に溶解して、患者に投与することができる。経口投与した場合には、消化管内で分解を受けるため、該投与方法は効果的ではないが、消化管内での分解を受けにくい製剤、例えばポリソームやマイクロスフェア、ナノスフェアに内包した形態で経口投与することも可能である。また、直腸、鼻腔内、舌下等の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。1日投与量としては、例えば特開平3-218399号公報に記載されるように0.005~500mg/日、好ましくは0.1~10mg/日値が例示されるが、患者の年齢、体重、症状等に応じて適宜増減することができる。

【0039】このようにして得られた本発明の組成物は、凍結・乾燥・保存・加熱および再溶解の過程いずれにおいても安定であり、室温において長期の保存性に優れる。今回見いだされた安定化のための必須成分および吸着防止剤の成分はいずれも極めて高い安全性を有しており、本発明の組成物を医薬品として用いる場合に、長期間に渡り活性の低下や凝集塊等の心配がなく、極めて高い品質を維持する事ができる。また、本発明の組成物は低濃度の水溶液としたときも容器への吸着が防止され、医療現場において輸液にて希釈して投与する場合も吸着により有効量を減すことなく投与が可能となる。以上のように、安全かつ室温における長期の保存性に優れた血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能となった。更に、臨床使用時の容器への吸着が防止された血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能となった。また、本発明の組成物、製法、安定化剤、安定化方法、吸着防止剤あるいは吸着防止方法は可溶性トロンボモジュリンの精製工程でも利用でき、さらに各種用途に用いるための可溶性トロンボモジュリンの原体の保存にも利用できる。

【0040】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

(可溶性トロンボモジュリンの取得例1)

ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンの精製

特開平3-218399号公報の方法に準じてヒト尿中可溶性トロンボモジュリンを調製した。すなわち、原尿100Lを10% NaOHでpH8.5に調整し、析出した沈降物を除去した。次いで、尿のpHを4M HClでpH5.5に調整後、アクリロニトリル繊維で濾

過し尿中のウロキナーゼを吸着除去し、通過尿を分分子量4万の限外濾過膜を使用して脱塩濃縮した。

【0041】pHを7.3に調整後、60℃で15分間処理した。0.068M NaClを含有する0.05M 燐酸緩衝液(pH6.5)で予めコンディショニングしておいたDEAEセルロース(ワットマン社製)の300mLカラムに濃縮尿を通過させて活性画分を吸着させ、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液750mLで洗浄後、0.05M NaClを含む酢酸緩衝液(pH4.0)で活性画分を溶出した。

【0042】溶出液は、分分子量3万の限外濾過膜で濃縮し、2M NaOHでpH7.5に調整し、0.1M NaCl、1mM ベンザミジン塩酸塩および0.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で予めコンディショニングしたDIP-トロンビンアガロースの2.5mLカラムを通過させて活性画分を吸着させた。

【0043】次いで、コンディショニングに使用したと同じ緩衝液25mLで洗浄後、1M NaCl、1mM ベンザミジン塩酸塩および0.5mM EDTAを含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出し、この溶出液をコンディショニングに使用したと同じ緩衝液に対して透析後、再度前回と同様の条件にコンディショニングしたDIP-トロンビンアガロースクロマトグラフィーで精製した。2回目のDIP-トロンビンアガロースクロマトグラフィーにおいても同容のカラムを用い、コンディショニングで使用したと同じ緩衝液10mLで洗浄後、10mLの0.8M NaCl、1mM ベンザミジン塩酸塩および0.5mM CaCl<sub>2</sub>を含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄し、1M NaCl、1mM ベンザミジン塩酸塩および0.5mM EDTAを含む0.02M トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で活性画分を溶出した。

【0044】溶出液は、分分子量3万の限外濾過膜で濃縮し、予め0.14M NaClを含む0.01M 燐酸緩衝液(pH7.0)でコンディショニングしておいたセファクリルS-300(ファルマシアファインケミカル社製)の500mLカラムでゲル濾過し、活性画分を採取した(UTM0)。また、別の実験では非還元状態下のSDS-PAGEで分子量72,000±3,000に相当する活性画分(UTM1)、あるいは、分子量79,000±3,000に相当する活性画分を採取した(UTM2)。これらの画分は一晩蒸留水に対して透析した後凍結乾燥した。

【0045】このようにして得られた天然型のヒト尿中可溶性トロンボモジュリンUTM1およびUTM2はそれぞれ以下の部分構造および性質を有する。

(1) UTM1

イ) 分子量 72,000±3,000

[非還元状態でのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) により測定]

口) 等電点 3.9 ± 0.2

ハ) 末端アミノ酸配列 (配列表の配列番号1のアミノ酸配列)

N末端 :

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln-Cys-Val-Glu-His-Asp-Cys-Phe-Ala-Leu-Tyr-Pro-Gly-Pro-Ala-Thr-Phe-Leu

C末端 :

-Leu-Ala-Arg、または-Leu-Val-Arg

ニ) 糖含量 (重量%)

中性糖 : 5.5 ± 1.0 %

[フェノール硫酸法で測定]

アミノ糖 : 2.2 ± 1.0 %

[Elson-Morgan法 (Blix変法) で測定]

シアル酸 : 2.8 ± 1.5 %

[Warren法で測定]

【0046】(2) UTM2

イ) 分子量 79,000 ± 3,000

[非還元状態でのSDS-PAGEにより測定]

口) 等電点 3.8 ± 0.2

ハ) 末端アミノ酸配列 (配列表の配列番号1のアミノ酸配列)

N末端 :

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln-Cys-Val-Glu-His-Asp-Cys-Phe-Ala-Leu-Tyr-Pro-Gly-Pro-Ala-Thr-Phe-Leu

C末端 :

-Leu-Ala-Arg、または-Leu-Val-Arg

ニ) 糖含量 (重量%)

中性糖 : 6.2 ± 1.0 %

[フェノール硫酸法で測定]

アミノ糖 : 3.1 ± 1.0 %

[Elson-Morgan法 (Blix変法) で測定]

シアル酸 : 3.8 ± 1.5 %

[Warren法で測定]

【0047】(可溶性トロンボモジュリンの取得例2)

遺伝子組換え型ヒト可溶性トロンボモジュリンの製造 (RTM1)

WO92/00325号公報の方法で製造した。すなわち

ち、ヒト胎盤cDNAライブラリーより釣り上げたDNAを利用してアミノ酸456残基よりなる可溶性トロンボモジュリン (ruTM-Ala) を発現するベクターを調製し、これをCHO細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って高発現株を得た。この高発現株の培養液をDIPトロンビン-アガロースカラムとゲル濾過により精製し目的物を得た (RTM1)。

【0048】(可溶性トロンボモジュリンの取得例3) 遺伝子組換え型ヒト可溶性トロンボモジュリンの製造 (RTM2)

WO92/00325号公報の方法に準じて製造した。すなわち、ヒト胎盤cDNAライブラリーより釣り上げたDNAを利用してアミノ末端のアミノ酸配列がAla-Pro-Alaであるアミノ酸498残基よりなる可溶性トロンボモジュリンを発現するベクターを調製し、これをCHO細胞に組み込んだ後、遺伝子増幅を行って高発現株を得た。この高発現株の培養液をDIPトロンビン-アガロースカラムとゲル濾過により精製し目的物を得た (RTM2)。

【0049】本発明を詳細に説明するために実験例により効果を具体的に説明するが、本発明はこれらによつて、なんら限定されるものではない。

(実験例1) 前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM0を用いて、下記に示した凍結乾燥された注射剤を調製した。これらを50℃の恒温槽に保存し、3ヶ月目および6ヶ月目に残存力価を、6ヶ月目に該物質の凝集体生成率を測定した。測定方法は以下の方法により行った。結果を表1および表2に示す。尚、力価残存率は4℃にて同一時間保存した該物質の力価に対する%で表した。なお、本実験で用いたUTM0はUTM1とUTM2とがそれぞれ69%、31%含まれていた。製剤例1 UTM0 75mg力価とマルトース300mgを加え、注射用蒸留水30mLにて溶解した。この溶液を無菌ろ過後、無菌ガラスバイアルに1mLずつ分注した後、凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤を調製した。以下同様にして下記の成分を用いて製剤例2から9の製剤を調製した。

製剤例 2	UTM0	75 mg/力価
	ラクトース	300 mg
製剤例 3	UTM0	75 mg/力価
	蔗糖	300 mg
製剤例 4	UTM0	75 mg/力価
	塩酸アルギニン	600 mg
製剤例 5	UTM0	75 mg/力価
	グルコース	300 mg
製剤例 6	UTM0	75 mg/力価
	マンニトール	300 mg
製剤例 7	UTM0	75 mg/力価
	グリシン	600 mg
製剤例 8	UTM0	75 mg/力価
	精製ゼラチン	600 mg
製剤例 9	UTM0	75 mg/力価
	ヒト血清アルブミン	300 mg

【0050】（力価の測定方法）トロンビン共存下でのプロテインC活性化能を合成基質Glu-Pro-Arg-p-NA（カビ社製）を用い、持田製薬（株）で精製したヒト尿中可溶性トロンボモジュリン（UTM0）を標準物質として使用した。すなわち、0.05%ポリソルベート20/トリス塩酸緩衝液（pH8.4）で適当濃度に希釈した標準物質もしくは本発明の可溶性トロン

ボモジュリン含有製剤20μLに20mM CaCl<sub>2</sub>/トリス塩酸緩衝液（pH8.4）60μL、さらに牛トロンビン（持田製薬製）40U/mL溶液を20μL添加し、室温で20分間反応する。次いでヒトプロテインC（アメリカンダイアグノスティカ社製）12U/mL溶液を20μL添加し、室温で20分間反応後、反応液にヒトアンチトロンビンIII（ミドリ十字製）とヘパリン（持田製薬製）の混合液（終濃度はそれぞれ0.15U/mL、15U/mL）80μLを添加し、室温で20分間反応する。次いで、反応液を125μL採取し、前記合成基質3mM溶液125μLを添加し、室温で経時的に405nmの波長における吸光度を測定し、反応初期速度を求める。標準溶液について得られた反応初期速度から検量線を作成し、試料の力価を算出した。力価は特開平3-218399号公報の記載に従ってウサギ肺トロンボモジュリンに換算した。

【0051】（凝集体生成率の測定方法）可溶性トロンボモジュリンの凝集体生成率をTSK-gel™ G3000SW<sub>XL</sub>（東洋曹達製）を用いたゲル濾過法により測定した。

【0052】

表 1

		添 加 剤		力価残存率 (%)	
		種 類	量 (mg)	3ヶ月	6ヶ月
実施例	製剤例 1	マルトース	300	99.6	98.9
	製剤例 2	ラクトース	300	99.8	99.3
	製剤例 3	蔗糖	300	98.4	98.7
	製剤例 4	塩酸アルギニン	600	99.6	99.6
比較例	製剤例 5	グルコース	300	96.0	97.6
	製剤例 6	マンニトール	300	91.3	89.3
	製剤例 7	グリシン	600	92.9	82.2
	製剤例 8	精製ゼラチン	600	89.0	95.6
	製剤例 9	HSA	300	87.7	84.8

【0053】

表 2

		添 加 剤		凝集体生成率 (%)	
		種 類	量 (mg)	凍結乾燥直後	6ヶ月
実施例	製剤例1	マルトース	300	0.0	0.8
	製剤例2	ラクトース	300	—	0.0
	製剤例3	蔗糖	300	—	0.6
	製剤例4	塩酸アルギニン	600	0.0	0.0
比較例	製剤例5	グルコース	300	1.4	3.4
	製剤例6	マンニトール	300	0.0	4.0
	製剤例7	グリシン	600	—	5.7

表1および表2に示すように、マルトース、ラクトース、蔗糖および塩酸アルギニンを添加した場合、グルコース、マンニトール、グリシン、精製ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)等の他の一般的な添加剤を添加した場合に比較してヒト尿中可溶性トロンボモジュリンが有意に安定化された。すなわち、ヒト可溶性トロンボモジュリンの保存安定性が有意に増大した。その効果は、ラクトースおよび塩酸アルギニンでより顕著であった。

【0054】(実験例2)前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM1あるいはUTM2を

組成物例2	UTM1	2.5mg力価
	ラクトース	10mg
組成物例3	UTM2	2.5mg力価
	塩酸アルギニン	20mg
組成物例4	UTM1	2.5mg力価
	蔗糖	10mg
組成物例5	UTM1	2.5mg力価
	マンニトール	10mg
組成物例6	UTM1	2.5mg力価
	グリシン	20mg
組成物例7	UTM1	2.5mg力価
	精製ゼラチン	20mg
組成物例8	UTM1	2.5mg力価
	HSA	10mg

【0055】

用いて、下記に示した凍結乾燥された組成物を調製した。これらを40℃温度75%の恒温槽に保存し、6ヶ月目に残存力価と該物質の凝集体生成率を測定した。測定方法は上記実験例1の方法により行った。結果を表3および表4に示す。尚、力価残存率は実験開始時の力価に対する%で表した。

組成物例1 UTM2 2.5mg力価とマルトース10mgを加え、精製水1mLにて溶解した。この溶液を凍結乾燥した。以下同様に下記の成分で構成されている組成物例2から8の組成物を調製した。

【表1】

表 3

組成物例	可溶性トロンボモジュリン	種類	mg力価	添加剤		力価残存率(%)	
				種類	量(mg)	凍結乾燥直後	6ヶ月
実施例	1	UTM2	2.5	マルトース	10	100.2	99.1
	2	UTM1	2.5	ラクトース	10	—	102.3
	3	UTM2	2.5	塩酸アルギニン	20	—	100.9
	4	UTM1	2.5	蔗糖	10	—	99.6
比較例	5	UTM1	2.5	マンニトール	10	99.8	96.5
	6	UTM1	2.5	グリシン	20	—	96.2
	7	UTM1	2.5	糖質ゼラチン	20	102.3	87.3
	8	UTM1	2.5	HSA	10	—	90.9

【0056】

表 4

組成物例	可溶性トロンボモジュリン	種類	mg力価	添加剤		凝集体生成率(%)
				種類	量(mg)	
実施例	1	UTM2	2.5	マルトース	10	0.7
	2	UTM1	2.5	ラクトース	10	0.4
	3	UTM2	2.5	塩酸アルギニン	20	0.0
	4	UTM1	2.5	蔗糖	10	0.0
比較例	5	UTM1	2.5	マンニトール	10	4.0
	6	UTM1	2.5	グリシン	20	2.9

表3および表4に示すように、マルトース、ラクトース、蔗糖および塩酸アルギニンを添加した場合、他の一般的な添加剤を添加した場合に比較してヒト尿中可溶性トロンボモジュリンが顕著に安定化された。特に長期間に渡る安定化効果があった。

#### 【0057】(実験例3)

##### 溶液安定性試験

前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM0を用いて、マルトース、ラクトース、蔗糖あるいは塩酸アルギニンを0.5ないし5mg/mL含有する0.05mg力価/mLの可溶性トロンボモジュリン溶液を調製した。これらを室温に保存し、24時間後に残存力価を測定した。測定方法は前記実験例1の方法により行った。いずれの組成物においても顕著な活性の低下は認められなかった。

【0058】可溶性トロンボモジュリンが変性して凝集体を生じ、凝集体が混在したままヒト血中に投与された場合、その凝集体は変性した蛋白質であるため、過敏症等の免疫反応を惹起する、あるいは塞栓症を誘発する危

険性がある。従って、凝集体生成率が低いことは、注射用医薬製剤において重要な利点である。さらに、製剤を開発する場合、室温で長期間保存可能かどうかは、一般に40℃、6ヶ月間保存での安定性を目安として判断するが、本発明で得られる可溶性トロンボモジュリン含有製剤は前述の実験例で示されるように、より過酷な条件である50℃、6ヶ月間の保存でも極めて安定であった。また、溶液状態で保存性もよく、凍結乾燥型の組成物を医薬として用いる場合にも再溶解後に安心して使用することが確認された。

【0059】(実験例4) 前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM0を用いて、下記に示した溶液状の組成物を調製し、力価を測定した。他に、対照としてUTM0 2.5mg力価を生理食塩液2mLにて溶解した溶液を用意し、力価を測定した。これら0.24mLをシリンジを用いてプラスチック製容器に入った生理食塩液(100mL)に混注し、可溶性トロンボモジュリンの理論終濃度を約0.003mg力価/mLとした。混注後3時間目に液を採取し、残存力価を

測定した。力価測定方法は前記実験例1の方法により行った。

組成物例9 UTM0 2.5mg力価とポリソルベート80 5mgを加え、生理食塩液2mlにて溶解し

た。

組成物例10 UTM0 2.5mg力価と精製ゼラチン 10mgを加え、生理食塩液2mlにて溶解した。

【0060】

5

表

	組成物例	添加剤		容器内保存後の残存率(%)
		種類	終濃度(%)	ブラボトル
実施例	9	ポリソルベート80	0.0006	96.9
比較例	10	精製ゼラチン	0.0012	87.5
対照例		—	—	79.6

表5に示すように、ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンはプラスチック製容器に対して著しい吸着を示した。ポリソルベート80を添加するとゼラチン添加に比べて、顕著に吸着が防止された。

【0061】(実験例5) 前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTM0を用いて、下記に示した溶液状の組成物を調製し、力価を測定した。他に対照としてUTM0 2.5mg力価を生理食塩液2mlにて溶解した溶液を用意し、力価を測定した。これら1mlを輸液セット(テルフュージョン<sup>®</sup> TS-A200CK、テルモ製)を装着した生理食塩液(大塚生食注、

500ml、プラスチック製容器)に混注し、可溶性トロンボモジュリンの理論終濃度を約0.0025mg力価/mlとした。混注直後に輸液セットを通して得られた液、また、3時間後にブラボトルから直接採取して得られた液について残存力価を測定した。力価測定方法は前記実験例1の方法により行った。

組成物例11 UTM0 2.5mg力価とポリソルベート80 1mgを加え、生理食塩液2mlにて溶解した。以下同様に下記の成分で構成されている組成物例2から6の組成物を調製した。

組成物例12	UTM0	2.5mg力価
	ポリソルベート80	0.5mg
組成物例13	UTM0	2.5mg力価
	ポリソルベート20	1mg
組成物例14	UTM0	2.5mg力価
	ポリソルベート20	0.5mg
組成物例15	UTM0	2.5mg力価
	ブルロニックF68	5mg
組成物例16	UTM0	2.5mg力価
	ブルロニックF68	1mg

【0062】

表 6

		添 加 剤		輸液セット 通過後の残 存率 (%)	プラボトル 内保存後の 残存率 (%)
		種 類	終濃度 (%)		
実 施 例	11	ポリソルベート80	0.0001	87.4	103.3
	12	ポリソルベート80	0.0005	86.2	87.0
	13	ポリソルベート20	0.0001	84.2	91.3
	14	ポリソルベート20	0.0005	83.6	83.4
	15	プルロニックF68	0.0005	94.8	92.2
	16	プルロニックF68	0.0001	92.7	87.5
対 照 例		—	—	63.3	79.1

表6に示すように、ポリソルベート80、ポリソルベート20、プルロニックF68を添加した場合、その濃度が0.00005wt%以上でヒト尿中可溶性トロンボモジュリン希薄水溶液の輸液セット並びにプラスチック製容器中での活性が維持されることが判明した。

【0063】(実験例6) 前述の可溶性トロンボモジュリンの取得例1で得られたUTMOを用いて、下記に示した凍結乾燥された注射剤を調製した。これらを50℃の恒温槽に保存し、3カ月および6カ月目に力価残存率

製剤例11 UTMO

塩酸アルギニン

ポリソルベート80

精製ゼラチン

製剤例12 UTMO

マルトース

プルロニックF68

製剤例13 UTMO

マルトース

プルロニックF68

精製ゼラチン

を測定した。測定方法は上記実験例1の方法により行った。結果を表7に示す。尚、力価残存率は凍結乾燥直後の力価に対する%で表した。製剤例10 UTMO 150mg力価、塩酸アルギニン1200mgおよびプルロニックF68 60mgを加え、注射用蒸留水60mLにて溶解した。この溶液を無菌ろ過後、無菌ガラスバイアルに2mLずつ分注した後、凍結乾燥し、用時溶解型の注射剤を調製した。以下同様に下記の成分を用いて製剤11から13の製剤を調製した。

150mg力価

1200mg

60mg

300mg

150mg力価

600mg

60mg

150mg力価

600mg

60mg

300mg

【0064】

表 7

	添 加 剤		力価残存率 (%)	
	種 類	量 (mg)	3カ月	6カ月
製剤例10	塩酸アルギニン ブルロニックF68	1200 60	100.4	101.0
製剤例11	塩酸アルギニン ポリソルベート80 精製ゼラチン	1200 60 300	99.3	100.2
製剤例12	マルトース ブルロニックF68	600 60	100.4	100.1
製剤例13	マルトース ブルロニックF68 精製ゼラチン	600 60 300	99.2	99.7

表7に示すように、アルギニンあるいはマルトースと非イオン性界面活性剤を組み合わせで添加した場合、ヒト尿中可溶性トロンボモジュリンの長期間に渡る保存安定性が有意に増大した。従って、長期保存時でも安定性に優れ、低濃度に希釈したときも容器への吸着が起こらな

(実施例1)

UTMO 10mg力価  
ラクトース 100mg  
精製ゼラチン 100mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

(実施例2)

UTMO 25mg力価  
ラクトース 100mg  
ブルロニックF68 10mg  
リン酸水素二ナトリウム・12水和物 0.77mg  
リン酸二水素ナトリウム・2水和物 0.18mg  
塩化ナトリウム 2.73mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

(実施例3)

UTMO 25mg力価  
L-アルギニン塩酸塩 200mg  
ポリソルベート80 10mg  
リン酸水素二ナトリウム・12水和物 0.77mg  
リン酸二水素ナトリウム・2水和物 0.18mg  
塩化ナトリウム 2.73mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、

い可溶性トロンボモジュリン含有組成物が得られることが確認できた。

【0065】(製剤実施例)次に実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によってなら限定されるものではない。

組成物を調製した。

【0066】

組成物を調製した。

【0067】

無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、



凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【0068】

(実施例4)

UTMO	25mg力価
L-アルギニン塩酸塩	200mg
プロロニックF68	10mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0069】

(実施例5)

UTMO	50mg力価
マルトース	100mg
精製ゼラチン	100mg
リン酸水素ナトリウム・12水和物	23.2mg
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	5.5mg
塩化ナトリウム	81.8mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。別に、0.1%ポリソルベート80水溶液を無菌的に調製し、1.0mLずつ分注して熔閉し、溶解用溶液アンブルとした。

20

【0070】(実施例6) 実施例5と同成分の可溶性ト

【0071】

(実施例7)

UTMO	25mg力価
蔗糖	100mg
精製ゼラチン	100mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。別に、0.1%ポリソルベート80水溶液を無菌的に調製し、1.0mLずつ分注して熔閉し、溶解用溶液アンブルとした。

【0072】(実施例8) 実施例7と同成分の可溶性ト

【0073】

(実施例9)

UTM1	25mg力価
ラクトース	800mg
精製ゼラチン	100mg
リン酸水素ナトリウム・12水和物	23.2mg
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	5.5mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0074】

(実施例10)

UTM2	50mg力価
L-アルギニン塩酸塩	200mg
精製ゼラチン	100mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0075】

(実施例11)

UTM1	10mg力価
蔗糖	100mg
ポリソルベート80	50mg

リン酸水素ナトリウム・12水和物 23.2mg  
 リン酸二水素ナトリウム・2水和物 5.5mg  
 上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、  
 凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

【0076】

## (実施例12)

UTM2 50mg力価  
 L-アルギニン塩酸塩 200mg  
 精製ゼラチン 100mg  
 ポリソルベート80 10mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、  
 凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0077】

## (実施例13)

RTM1 25mg力価  
 ラクトース 200mg  
 ポリソルベート80 10mg  
 リン酸水素ナトリウム・12水和物 0.77mg  
 リン酸二水素ナトリウム・2水和物 0.18mg  
 塩化ナトリウム 81.8mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、  
 凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0078】

## (実施例14)

RTM1 25mg力価  
 ラクトース 200mg  
 ブロニックF68 10mg  
 リン酸水素ナトリウム・12水和物 0.77mg  
 リン酸二水素ナトリウム・2水和物 0.18mg  
 塩化ナトリウム 81.8mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、  
 凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0079】

## (実施例15)

RTM2 25mg力価  
 ラクトース 100mg  
 精製ゼラチン 100mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填し、  
 凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。  
 別に、0.1%ポリソルベート80水溶液を無菌的に調製し、1.0mLずつ分注して凝固し、溶解用溶液アンブルとした。

【0080】(実施例16) 実施例15と同成分の可溶

【0081】

## (実施例17)

RTM2 10mg力価  
 マルトース 100mg  
 精製ゼラチン 100mg  
 リン酸水素ナトリウム・12水和物 0.77mg  
 リン酸二水素ナトリウム・2水和物 0.18mg  
 塩化ナトリウム 81.8mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を10mLとし、  
 無菌濾過した後1.0mLずつ無菌バイアルに充填

し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【0082】

(実施例 18)

RTM2	10mg 力価
マルトース	100mg
精製ゼラチン	100mg
ブルロニック F 68	10mg
リン酸水素ナトリウム・12水和物	0.77mg
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	0.18mg
塩化ナトリウム	81.8mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解した全量を 10mL とし、無菌濾過した後 1.0mL ずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結

乾燥組成物を調製した。

【0083】

(実施例 19)

UTM0	25mg 力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩	100mg
ラクトース	100mg
ポリソルベート 80	10mg
リン酸水素ナトリウム・12水和物	0.77mg
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	0.18mg
塩化ナトリウム	2.73mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を 10mL とし、無菌濾過した後 1.0mL ずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0084】

(実施例 20)

UTM0	25mg 力価
Ｌ－アルギニン塩酸塩	100mg
マルトース	100mg
ブルロニック F 68	10mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を 10mL とし、無菌濾過した後 1.0mL ずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥

組成物を調製した。

【0085】

(実施例 21)

UTM1	10mg 力価
ラクトース	100mg
蔗糖	100mg
ポリソルベート 80	50mg
リン酸水素ナトリウム・12水和物	23.2mg
リン酸二水素ナトリウム・2水和物	5.5mg

上記成分を注射用蒸留水に溶解し全量を 10mL とし、無菌濾過した後 1.0mL ずつ無菌バイアルに充填し、凍結乾燥して、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥組成物を調製した。

【0086】

【発明の効果】本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は、凍結・乾燥・保存・加熱および再溶解の過程いずれにおいても安定であり、特に、凍結乾燥した本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物については室温において長期間に渡る保存性に優れる。今回見いだされた安定化のための必須成分および吸着防止剤はいずれ

も極めて高い安全性を有しており、本発明の組成物を医薬品として用いる場合に、長期間に渡り活性の低下や凝集物の出現等の心配がなく、極めて高い品質を維持することができる。とくに凍結乾燥製剤は、50℃で6ヶ月の保存でも十分に安定である。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物は低温度の水溶液としたときも容器への吸着が防止され、医療現場において輸液にて希釈して投与する場合も吸着により有効量を減ずることなく投与が可能となる。従って、安全でかつ室温における長期の保存性に優れた、血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能である。更に、臨床使

用時の容器への吸着が防止された、血液凝固疾患に係わる疾病の予防治療薬を提供することが可能である。また、本発明の可溶性トロンボモジュリン含有組成物、その製法、可溶性トロンボモジュリンの安定化剤、安定化方法、吸着防止剤あるいは吸着防止方法は可溶性トロンボモジュリンの精製工程でも利用でき、さらに各種用途に用いるための可溶性トロンボモジュリンの原体の保存にも利用できる。

【0087】

【配列表】 SEQUENCE LISTING

<1> Mchida Pharmaceutical Co., Ltd.  
 <2> Composition Containing Soluble Thrombomodulins  
 <3> MDD397/F01  
 <4> EBB-05-01

フロントページの続き

(72)発明者 島 誠七  
 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内

<10> 1  
 <20> 1  
 <21> 28  
 <22> FRT  
 <23> human  
 (400) 1  
 Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly  
 1 5  
 Gly Ser Gln Cys Val Glu His Asp  
 10 15  
 Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro  
 20  
 Ala Thr Phe Leu  
 25

(72)発明者 鈴木 茂治  
 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内  
 (72)発明者 工藤 弓夫  
 東京都新宿区四谷一丁目7番地 持田製薬株式会社内